



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAI

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/13, C07K 16/34, A61K 39/395,</b> <b>C12N 15/86</b>	<b>A1</b>	<b>(11) I</b> <b>WO 9607740A1</b> <b>(43) Date de publication internationale: 14 mars 1996 (14.03.96)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR95/01143 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 1er septembre 1995 (01.09.95)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 94/10566 2 septembre 1994 (02.09.94) FR  <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). PROTEINE PERFORMANCE [FR/FR]; Route d'Alès, F-30380 Saint-Christol-lès-Alès (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> EDELMAN, Léna [FR/FR]; 6, rue Fessart, F-92100 Boulogne (FR); MARGARITTE, Christel [FR/FR]; 16, rue du Général-de-Gaulle, F-92290 Chatenay-Malabry (FR). KACZOREK, Michel [FR/FR]; 81, boulevard de la Lironde, F-34980 Montferrier (FR). CHAABIHI, Hassan [MA/FR]; 30 B, avenue Jules-Guesdes, F-30100 Alès (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> ORES, Irène etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title: MONOCLONAL RECOMBINANT ANTI-RHESUS D (D7C2) ANTIBODY</b> <b>(54) Titre: ANTICORPS MONOCLONAL RECOMBINANT ANTI-RHESUS D (D7C2)</b>  <b>(57) Abstract</b> <p>Cloning of DNA fragments which code for the light chain or the heavy chain variable domain of the D7C2 monoclonal antibody within a baculovirus. The invention also concerns the expression of these DNA fragments in insect host cells, the anti-rhesus D recombinant monoclonal antibody so obtained and its use.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention est relative au clonage de fragments d'ADN qui codent pour le domaine variable de la chaîne légère ou de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal D7C2, dans un baculovirus, à leur expression dans des cellules-hôte d'insecte, à l'anticorps monoclonal recombinant anti-Rhésus D obtenu de la sorte, et à ses utilisations.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## Anticorps monoclonal recombinat anti-Rhésus D (D7C2)

La présente Invention est relative à  
5 l'obtention en cellules d'insecte, d'un anticorps monoclonal recombinant anti-Rhésus D.

On désigne communément sous le terme "Rhésus positif", ou "Rh-positif" les sujets dont les hématies sont agglutinées par des alloanticorps dirigés contre  
10 l'antigène D (qui est l'un des antigènes du système RH), et sous le terme "Rhésus négatif", ou "Rh-négatif" les sujets dont les hématies ne sont pas agglutinées par ces alloanticorps.

La maladie hémolytique du nouveau né est due  
15 dans la majorité des cas, à la présence, chez une mère Rh-négatif, d'alloanticorps anti-RhésusD (l'allo-immunisation contre d'autres antigènes du système RH est beaucoup plus rare), qui provoquent chez un fœtus Rhésus positif une anémie hémolytique qui va nécessiter, soit  
20 des transfusions *in utero*, soit une exsanguino-transfusion à la naissance dans les cas graves.

L'allo-immunisation de la mère intervient généralement lors d'un accouchement précédent ; des hématies fœtales passent dans la circulation maternelle,  
25 et induisent une immunisation si l'enfant est Rh-positif.

La prévention de la maladie hémolytique du nouveau né consiste en l'injection d'anticorps anti-Rhésus D, aux femmes Rhésus négatif, immédiatement après un accouchement ou une interruption de grossesse.

30 Actuellement, les anticorps anti-Rhésus utilisés dans ce but sont des immunoglobulines polyclonales provenant de donneurs volontaires Rhésus négatif, immunisés à plusieurs reprises contre des hématies Rh-positif.

35 Ceci pose des problèmes, d'une part du fait de la nécessité de disposer de volontaires en nombre

suffisant pour répondre aux besoins, et d'autre part du fait des risques de contamination par des virus ou autres pathogènes qui pourraient être présents dans les préparations d'immunoglobulines obtenues à partir du sang  
5 des volontaires.

Cependant, ce mode de production n'a à l'heure actuelle aucune alternative. En effet, bien qu'il existe des essais de culture de lignées lymphoblastoïdes, issues de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr,  
10 et sécrétant des anticorps monoclonaux, aucun produit obtenu à partir de ce type de cultures n'a reçu l'autorisation de mise sur le marché du fait des risques impliqués par l'utilisation du virus Epstein-Barr.

Afin d'obtenir une source d'immunoglobulines  
15 anti-Rhésus D ne présentant pas les inconvénients des immunoglobulines utilisées jusqu'à présent, les Inventeurs se sont fixé pour but la production d'un anticorps monoclonal humain anti-Rhésus recombinant dans des cellules d'insecte, en utilisant un vecteur  
20 d'expression dérivé d'un baculovirus.

Dans ce but les Inventeurs ont d'abord sélectionné une lignée produisant un anticorps monoclonal anti-Rhésus D, dénommé D7C2. Cet anticorps appartient à la classe des IgM, agglutine les hématies de phénotype  
25 Rhésus courant, les Rhésus faibles, et la plupart des Rhésus partiels à l'exception des D<sup>VI</sup> ; cet anticorps se lie à un polypeptide de 30 à 32 Kda de la membrane des hématies.

Les Inventeurs ont ensuite cloné les séquences  
30 codant pour les régions variables des chaînes lourde (H) et légère (L) de D7C2, et ont construit des cassettes d'expression permettant l'expression de chacune desdites séquences sous contrôle d'un promoteur fort de baculovirus.

La présente Invention a pour objet un fragment d'ADN, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par :

- un fragment d'ADN qui comprend une séquence  
5 qui code pour la région variable de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal D7C2 ;

- un fragment d'ADN qui comprend une séquence qui code pour la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal D7C2.

10 Par : "séquence qui code pour la région variable de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal D7C2", on entend en particulier la séquence identifiée dans la liste de séquences en annexe sous le numéros SEQ ID N0: 1, qui code pour le polypeptide SEQ ID N0: 2.

15 Par : "séquence qui code pour la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal D7C2", on entend en particulier la séquence SEQ ID N0: 3 qui code pour le polypeptide SEQ ID N0: 4.

Cependant, il apparaîtra à l'homme de l'art  
20 que cette définition englobe également des séquences fonctionnellement équivalentes aux séquences SEQ ID N0: 1 et SEQ ID N0: 3, à savoir, en particulier :

- toute séquence codant pour les polypeptides  
SEQ ID N0: 2 et SEQ ID N0: 4, et également

25 - des séquences codant pour des polypeptides qui peuvent différer des polypeptides SEQ ID N0: 2 et SEQ ID N0: 4 par quelques acides aminés, à condition que cette variation ne se situe pas au niveau d'une séquence peptidique impliquée dans la reconnaissance de l'épitope.

30 Ceci englobe par exemple une séquence codant pour un polypeptide dont la séquence diffère de celle du polypeptide SEQ ID N0: 4 par le remplacement du résidu Thr en position 23, par un résidu Ala, ce qui résulte du remplacement d'un A en position 67 dans la séquence  
35 SEQ ID N0: 3, par un G.

Des séquences fonctionnellement équivalentes aux séquences SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO: 3, sont également des séquences résultant d'une modification des extrémités de celles-ci en vue d'y créer des sites de restriction, ou de modifier ou supprimer ceux qui y sont  
5 présents. Ceci englobe par exemple une séquence codant pour un polypeptide dont la séquence diffère de celle du polypeptide SEQ ID NO: 2 par le remplacement des trois premiers résidus, Asp-Ile-Glu, par les résidus Gln-Ser-  
10 Val, ce qui résulte du remplacement d'un A en position 67 dans la séquence SEQ ID NO: 3, par un G.

La présente Invention a également pour objet une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour la région variable de la chaîne légère de  
15 l'anticorps monoclonal D7C2, ou une séquence codant pour la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal D7C2, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

Selon un mode de réalisation préféré de la  
20 présente Invention, ledit promoteur est un promoteur de baculovirus.

A titre d'exemple de promoteurs de baculovirus utilisables pour la mise en oeuvre de la présente Invention, on citera les promoteurs de la polyédrine et  
25 de P10 des baculovirus AcMNPV ou SLMNPV, ou des dérivés de promoteurs de baculovirus, constitués par des promoteurs synthétiques ou recombinants, obtenus à partir d'un promoteur de baculovirus, et fonctionnels en cellules d'insectes, tel que par exemple celui décrit par  
30 WANG et al, [Gene, 100, 131-137, (1991)].

Une cassette d'expression conforme à ce mode de réalisation comprend par exemple:

- un promoteur de baculovirus, tel que défini ci-dessus ;
- 35 - une séquence codant pour un peptide signal de sécrétion ;

- une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal D7C2 et une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère d'une immunoglobuline ; ou

- 5                   - une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal D7C2 et une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne lourde d'une immunoglobuline.

Un grand nombre de séquences codant pour des  
10 peptides signal fonctionnels en cellules d'insecte sont utilisables pour la mise en oeuvre de la présente Invention. A titre d'exemple non limitatif, on citera les séquences codant pour les peptides signal de l'acétylcholinestérase de Drosophile, de la  
15 trophoblastine ovine, ainsi que les séquences codant pour les peptides signal des chaînes H et L d'immunoglobulines murines ou humaines, etc...

Chacune des cassettes conformes à l'invention permet l'expression, soit de la chaîne légère, soit de la  
20 chaîne lourde, d'un anticorps recombinant, dénommé ci-après r-D7C2, possédant la spécificité de l'anticorps monoclonal D7C2.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, les séquences codant pour les domaines  
25 constants des chaînes légères et lourdes d'immunoglobuline sont des séquences d'origine humaine.

On peut choisir la séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère parmi les séquences codant pour les domaines constants des chaînes légères  
30 kappa ( $\kappa$ ) et lambda ( $\lambda$ ).

On peut choisir la séquence codant pour le domaine constant de la chaîne lourde parmi les séquences codant pour les domaines constants des chaînes lourdes  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ , et  $\mu$ . On peut ainsi obtenir un anticorps  
35 recombinant appartenant à la classe d'immunoglobuline

(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM) que l'on souhaite.

Très avantageusement, on choisira une séquence codant pour le domaine constant C $\gamma$  d'une chaîne lourde  $\gamma$ .  
5 L'anticorps recombinant r-D7C2 obtenu de la sorte, appartient à la classe des IgG, et sera dénommé ci-après r-IgG-D7C2.

Les séquences codant pour la chaîne légère et pour la chaîne lourde d'un anticorps r-IgG-D7C2, 10 d'isotype IgG1, sont respectivement représentées dans la liste de séquence en annexe sous les numéros SEQ ID N°: 5 et SEQ ID N°: 7 ; les séquences polypeptidiques correspondantes portent les numéros d'identification respectifs SEQ ID N°: 6 et SEQ ID N°: 8.

15 La présente Invention a également pour objet des vecteurs recombinants, portant au moins une cassette d'expression telle que définie ci-dessus ; dans ce cadre, la présente Invention englobe en particulier des baculovirus recombinants permettant l'expression de 20 l'anticorps r-D7C2, ainsi que des plasmides de transfert permettant la construction desdits baculovirus recombinants.

Les plasmides de transfert conformes à l'invention portent un insert comprenant : une cassette 25 d'expression telle que définie ci-dessus, et de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome viral en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

30 Selon un mode de réalisation préféré des plasmides de transfert conformes à la présente Invention, lesdites séquences de baculovirus sont homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la 35 polyédrine.



Selon une disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, la cassette d'expression contenant le gène codant pour la chaîne légère de l'anticorps r-D7C2 est flanquée des régions  
5 entourant le gène de la polyédrine dans le baculovirus sauvage, et la cassette d'expression portant le gène codant pour la chaîne lourde de l'anticorps r-D7C2 est flanquée des régions entourant le gène P10 dans le baculovirus sauvage.

10 Schématiquement, la construction des plasmides de transfert conformes à l'invention se fait en insérant dans un plasmide capable de se répliquer chez un hôte bactérien (en général *E. coli*), la région du gène de baculovirus (par exemple p10 ou polyédrine, ou tout autre  
15 locus du baculovirus) à la place duquel on souhaite insérer les gènes codant pour les chaînes H ou L d'immunoglobuline. Dans cette région, la séquence codante du gène de baculovirus (et éventuellement la séquence promoteur dudit gène) est remplacée par la séquence  
20 codant pour la chaîne d'immunoglobuline à exprimer (et éventuellement par la séquence du promoteur sous contrôle duquel on souhaite exprimer cette chaîne d'immunoglobuline, s'il s'agit par exemple d'un promoteur "dérivé"). Le plasmide de transfert ainsi obtenu contient  
25 donc un insert comprenant une séquence hétérologue (séquence d'une chaîne de l'anticorps r-D7C2) flanquée de séquences de baculovirus.

Pour permettre l'expression simultanée de la chaîne lourde (chaîne H) et de la chaîne légère (chaîne  
30 L) et leur réassociation pour former la molécule d'anticorps recombinant, les Inventeurs ont inséré les deux cassettes sur un même vecteur d'expression. Ils ont ainsi obtenu un baculovirus double recombinant dans lequel la séquence codante de chacune des chaînes H et L  
35 est sous le contrôle d'un promoteur fort.

Un baculovirus recombinant conforme à l'Invention, permettant l'expression de l'anticorps r-D7C2, peut être construit selon le principe suivant :

- l'on prépare séparément deux plasmides de transfert, tels que définis ci-dessus : un pour la chaîne H, et un pour la chaîne L.

On cotransfecte ensuite les cellules d'insecte avec l'ADN des vecteurs de transfert ainsi réalisés et l'ADN du baculovirus. Cette cotransfection est effectuée en deux étapes :

Le plasmide de transfert contenant la cassette d'expression pour le gène de la chaîne légère flanquée des régions entourant le gène de la polyédrine dans le baculovirus sauvage, est utilisé, avec l'ADN de baculovirus sauvage AcMNPV, pour cotransfecter des cellules d'insecte en culture.

Par recombinaison homologue entre l'ADN viral et le plasmide, les séquences codantes de la chaîne légère de l'immunoglobuline recombinante sont transférées dans le génome viral.

Après répllication de l'ADN viral dans les cellules transfectées, l'on procède à la sélection des baculovirus recombinants ayant intégré la séquence de la chaîne légère de l'immunoglobuline recombinante.

Ces baculovirus recombinants sont sélectionnés selon deux critères : leur incapacité à produire des polyèdres et leur capacité à exprimer la chaîne légère.

La Figure 1 illustre l'obtention du baculovirus exprimant la chaîne légère lambda de l'anticorps recombinant r-IgG-D7C2.

Dans une deuxième étape, les cellules sont cotransfectées avec l'ADN du baculovirus recombinant obtenu à l'issue de la première étape, et avec celui du plasmide de transfert contenant la cassette d'expression portant le gène codant pour la chaîne lourde de l'anticorps recombinant r-D7C2 flanquée des régions

entourant le gène P10 du baculovirus. Par recombinaison homologue, comme précédemment, le gène de la chaîne lourde est transféré dans l'ADN viral.

L'on sélectionne alors les virus double-  
5 recombinants qui sont capables de produire simultanément une chaîne lourde et une chaîne légère d'immunoglobuline. La détection de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'immunoglobuline est effectuée par ELISA.

La Figure 2 illustre cette deuxième étape qui  
10 permet d'obtenir un baculovirus exprimant la chaîne légère lambda et la chaîne lourde gamma de l'anticorps recombinant r-IgG-D7C2.

La présente Invention a pour objet un baculovirus recombinant caractérisé en ce qu'il  
15 comprend au moins une cassette d'expression, telle que définie ci-dessus, comprenant une séquence codant tout ou partie de la chaîne H ou une séquence codant pour tout ou partie de la chaîne L de l'anticorps r-D7C2, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un  
20 promoteur fort de baculovirus.

Selon un mode de réalisation d'un baculovirus recombinant conforme à l'invention il comprend une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne H et une cassette d'expression comprenant la  
25 séquence codant pour la chaîne L, de l'anticorps monoclonal r-D7C2.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne L de l'anticorps  
30 monoclonal r-D7C2, et le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne H de l'anticorps monoclonal r-D7C2, sont deux promoteurs différents.

Selon une modalité avantageuse de cette  
35 disposition, l'un dedit promoteurs est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le

promoteur de la polyédrine et l'autre est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.

Selon encore une autre modalité avantageuse de cette disposition, l'un des promoteurs est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés, et l'autre est le promoteur de la p10 ou l'un de ses dérivés.

Avantageusement, le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne légère de l'anticorps r-D7C2 est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés, et le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne lourde de l'anticorps r-D7C2 est le promoteur de la P10 ou l'un de ses dérivés.

Selon une autre disposition de ce mode de réalisation, la séquence codant pour le peptide signal associé à la chaîne L de l'anticorps monoclonal r-D7C2, et la séquence codant pour le peptide signal associé à la chaîne H de l'anticorps monoclonal r-D7C2, sont deux séquences différentes.

Un baculovirus recombinant conforme à l'Invention, qui comprend une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne  $\lambda$  et une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne  $\gamma 1$  de l'anticorps monoclonal r-IgG-D7C2, a été déposé le 19 août 1994, auprès de la C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur ROUX, Paris), sous le numéro I-1468.

La présente Invention englobe également des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant conforme à l'invention.

L'expression et la production de l'anticorps monoclonal recombinant r-D7C2 est obtenue *in vitro* dans des cellules d'insecte conformes à l'invention.

L'infection des cellules par un baculovirus double recombinant conforme à l'Invention résulte dans la production simultanée des chaînes H et L. Ces chaînes s'assemblent pour reconstituer l'anticorps monoclonal  
5 recombinant r-D7C2 qui est par la suite sécrété dans le milieu de culture.

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une étape  
10 au cours de laquelle l'on cultive des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant conforme à l'invention, et une étape au cours de laquelle l'on obtient ledit anticorps à partir du milieu de culture.

La présente Invention a également pour objet  
15 un anticorps monoclonal recombinant, caractérisé en ce que ses domaines variables ont la séquence des domaines variables de l'anticorps monoclonal D7C2 ; ceci englobe en particulier les préparations d'anticorps monoclonal recombinant r-D7C2 susceptibles d'être obtenues par le  
20 procédé conforme à l'invention, défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation préféré de l'anticorps monoclonal recombinant r-D7C2, il appartient à la classe des IgG.

Selon une disposition préférée de ce mode de  
25 réalisation, ledit anticorps r-D7C2 est d'isotype IgG1.

Un anticorps recombinant conforme à l'Invention peut être utilisé pour le diagnostic, ou pour la thérapeutique. Une utilisation particulièrement intéressante concerne l'obtention de médicaments destinés  
30 à la prévention de la maladie hémolytique du nouveau-né.

Dans ce but, on utilisera en particulier, un anticorps recombinant r-IgG-D7C2, de classe IgG, qui possède une activité effectrice ADCC, dont est dépourvu l'anticorps parental D7C2, qui est une IgM.

35 La production d'un anticorps monoclonal anti-Rhésus D en cellules d'insecte permet d'éviter les

risques et les problèmes liés à l'immunisation de volontaires masculins Rh-D négatifs par injection de globules rouges humains RhD positifs, et de diminuer les risques de contamination par des virus ou autre  
5 pathogènes qui pourraient être présents dans les préparations d'immunoglobulines extraites du sang des volontaires.

En outre, ce mode de production présente les avantages suivants :

- 10 - sécurité pharmaceutique : l'utilisation de lignées cellulaires d'insecte et de baculovirus ne comporte pas le risque de virus adventices ou d'oncogènes qui se présente lorsque l'on utilise des lignées humaines ;
- 15 - standardisation du procédé de production, et du produit qui en est issu ;
- source d'approvisionnement en quantité quasi-illimitée.

La présente Invention sera mieux comprise à  
20 l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de baculovirus recombinants conformes à l'invention, et à leur utilisation pour la production d'un anticorps recombinant d'isotype IgG1, dénommé ci-après r-IgG-D7C2, dans des  
25 cellules d'insectes.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

30 **Exemple 1. : Obtention de l'anticorps D7C2, et clonage des chaînes lourdes et légères.**

**A) Description de l'anticorps D7C2 :**

La lignée humaine D7C2 a été obtenue après immortalisation par le virus Epstein-Barr de lymphocytes  
35 de sang périphérique provenant d'un donneur Rhésus

négatif (dce/dce) immunisé à 5 reprises avec des hématies Rhésus positif (DCe/DCe).

L'anticorps secrété par cette lignée est d'isotype IgM. Cet anticorps qui sera dénommé ci-après 5 IgM-D7C2, agglutine les hématies de phénotype Rhésus positif DCcee, DCCee, DccEE, Dccee, et n'agglutine pas les hématies Rhésus négatif ddccee, ddCcee, ddccEe. Il agglutine les rhésus faibles, et la plupart des rhésus partiels (agglutination de DIIIa, DIIIc, DIVa, DVa, DVC, 10 DVII, et Rh33), à l'exception des DVI. Il agglutine les hématies LW(a-b+), et n'agglutine pas les hématies r<sup>G</sup> et Rhmod. Les tests d'immuno-précipitation effectués sur des préparations de membranes de globules rouges Rhésus positif DCe/DCe solubilisées au TRITON X-100 ont montré 15 une liaison de l'anticorps IgM-D7C2 avec un polypeptide de 30 à 32 Kda environ.

B) Clonage et séquençage des parties variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère

L'ARN total est extrait des cellules du clone 20 D7C2 par le thiocyanate de guanidine, puis précipité à l'isopropanol. Après élimination de l'ADN par digestion à la DNase, l'ARN est précipité par NaCl (concentration finale 0,2M)

L'ADNc est synthétisé à partir de 1µg d'ARN 25 par transcription inverse, en utilisant une amorce oligo-dT.

les parties variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) sont amplifiées par ACP (amplification en chaîne par polymérase) à partir de 1µg d'ADNc simple 30 brin, en utilisant la Taq DNA polymérase.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

\* Pour VH :.

VH1 (SEQ ID NO : 9) :

CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG ;

VH2 (SEQ ID NO : 10) :

TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA ;

VH3 (SEQ ID NO : 11) :  
 GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA ;  
 VH4a (SEQ ID NO : 12) :  
 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA ;  
 5 VH4b (SEQ ID NO : 13) :  
 CGCTGTCTCTGGTTACTCCATCAG ;  
 VH5 (SEQ ID NO : 14) :  
 GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA ;  
 VH6 (SEQ ID NO : 15) :  
 10 CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG ;  
 \* Pour VL :  
 VλFW1 (SEQ ID NO : 16) :  
 CAGTCTGTGCTGACTCAG ;  
 Cλ (SEQ ID NO : 17) :  
 15 CACACYAGTGTRGCCTGGTT.  
 Trente cycles d'amplification sont ainsi effectués.

Après phosphorylation, le fragment amplifié est purifié sur gel d'agarose, puis ligaturé dans le  
 20 plasmide PTZ18R. Le plasmide obtenu est utilisé pour transformer *Escherichia coli* KL1 blue.

La sélection des bactéries transformées est faite par un test de résistance à l'ampicilline.

La séquence nucléotidique des inserts des  
 25 vecteurs plasmidiques respectivement dénommés PTZ-V<sub>L</sub> D7C2 et PTZ-V<sub>H</sub>D7C2 est déterminée à l'aide du kit de séquençage PROMEGA.

La séquence codant pour la région variable de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal humain IgM-  
 30 D7C2 est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 1 ; la séquence polypeptidique correspondante est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2.

La séquence codant pour la région variable de  
 35 la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal humain IgM-D7C2 est représentée dans la liste de séquences en annexe



sous le numéro SEQ ID NO : 3 ; la séquence polypeptidique correspondante est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4.

Les emplacements des CDR (régions déterminant la complémentarité) sont indiqués dans les caractéristiques des séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 3.

**Exemple 2 : Construction de plasmides de transfert portant les séquences variables de D7C2**

**A) PLASMIDE DE TRANSFERT POUR LA CHAÎNE LÉGÈRE LAMBDA :**

**1) Obtention du plasmide pBC $\lambda$**

**a- Plasmide pGmAc116T :**

Ce vecteur est dérivé du plasmide pGmAc115T [ROYER et al., J. Virol., 66, 3230-3235, (1992)], lui-même dérivé du plasmide pAc1 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671 (1993)] contenant le fragment EcoRI-I du baculovirus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* (AcMNPV), et donc le gène polyédrine, et les séquences flanquant ledit gène. Pour obtenir pGmAc116T, le plasmide pGmAc115T a été délété d'un fragment de 1900pb allant d'un site EcoRI situé en amont du gène polyédrine à un site XhoI situé 1900pb en aval de ce site EcoRI.

5  $\mu$ g du plasmide pGmAc115T ont été digérés pendant 2 heures à 37°C par 15 unités d'enzyme XhoI (BOEHRINGER), dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ l et dans les conditions préconisées par le fournisseur. Après extraction au phénol/chloroforme, l'ADN plasmidique a été précipité à l'alcool. Cet ADN a été ensuite partiellement coupé par EcoRI (BOEHRINGER) dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ l en présence de 0,5 unité d'enzyme. L'incubation a été faite à 37°C pendant 20 minutes. Après une nouvelle extraction au phénol/chloroforme, les extrémités générées par les coupures XhoI et EcoRI ont été rendues franches par l'enzyme de Klenow (BIOLABS) en présence des 4 dNTPs

selon le protocole préconisé par le fournisseur. L'ADN plasmidique a enfin été précipité à l'alcool et incubé avec la ligase du phage T4 (BOEHRINGER) dans les conditions préconisées par le fournisseur.

5 Des bactéries *E. coli* compétentes ont été transformées par une partie du mélange de ligation ; le criblage des colonies issues de cette transformation a permis de sélectionner le plasmide pGmAc116T. Ce plasmide contient un site BglII en aval du promoteur de la  
10 polyédrine.

b- Peptide signal :

La séquence codante choisie pour le peptide signal a été synthétisée chimiquement sous forme de deux oligonucléotides complémentaires ayant des extrémités  
15 permettant l'insertion du duplex dans un site BglII. Pour l'appariement, 15 µg de chacun des deux oligonucléotides sont incubés dans 50 µl de tampon (Tris 1 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM), pendant 5 minutes dans un bain marie à 70°C. Le bain est ensuite laissé refroidir jusqu'à température  
20 ambiante (22 à 25°C). Le produit d'appariement est utilisé directement dans les réactions de ligation avec le plasmide pGmAc116T préalablement coupé par BglII.

Les conditions de ligation sont les suivantes :

25 1µg du plasmide pGmAc116T coupé par BglII ; 1µg de l'oligonucléotide bicaténaire portant la séquence codant pour le peptide signal ; 2µl de tampon ligase 10X (BOEHRINGER) ; eau distillée q.s.p. 19µl ; 1 unité (1µl) de ligase (BOEHRINGER). L'incubation est effectuée à 22°C  
30 pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

c- Région constante CA :

La séquence codante de la région constante de la chaîne légère λ humaine a été amplifiée par ACP en  
35 utilisant comme matrice de l'ADNc de lymphocytes B humains. Les lymphocytes humains (environ  $5 \times 10^8$ ) ont été

préparés à partir de 200 ml de sang en utilisant HISTOPAQUE® (SIGMA). L'ARN total a été extrait de ces lymphocytes en utilisant un kit PHARMACIA (RNA extraction kit). Le premier brin d'ADNc a été préparé à partir de 5 l'ARN total à l'aide du kit "First-Strand cDNA synthesis kit" de PHARMACIA.

L'amplification par ACP de la région Cλ a été réalisée en présence de l'amorce OPP-HuCλ3' complémentaire de l'extrémité 3' des régions Cλ et 10 apportant le site de restriction BglII et de l'amorce OPP-HuCλ5' complémentaire de l'extrémité 5' des régions Cλ et apportant le site de restriction XhoI.

Les séquences des deux amorces sont les suivantes :

- 15 \*OPP-HuCλ3' (SEQ ID NO : 18) :  
5'-CCT GTC AGA TCT ATG AAC ATT CTG TAG GGG-3'  
(site BglII souligné)  
\*OPP-HuCλ5' (SEQ ID NO : 19) :  
5'-CCG CCC TCC CTC GAG CTT CAA-3'  
20 (site XhoI souligné)

Le produit de l'amplification a été digéré par BglII et XhoI avant d'être cloné dans les sites XhoI-BglII du plasmide pGmAc portant la séquence codant pour le peptide signal.

25 La composition du mélange de ligation est la suivante :

1µg du plasmide pGmAc coupé par XhoI et BglII ; 200 ng du fragment Cλ amplifié et digéré par BglII et XhoI, 2µl de tampon ligase 10X (BOEHRINGER), eau 30 distillée q.s.p. 19µl, 1 unité (1µl) de ligase (BOEHRINGER).

L'incubation est effectuée à 22°C pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

35 Le plasmide obtenu est dénommé pBCλ.

2) Clonage de la région variable de la chaîne  $\lambda$  de D7C2

Le clonage de la région variable de la chaîne légère  $\lambda$  de l'anticorps monoclonal humain IgM-D7C2 a été  
5 réalisé de la manière suivante :

La région variable  $\lambda$  de l'anticorps monoclonal IgM-D7C2 a été amplifiée par ACP en utilisant :

- comme matrice, l'ADN du plasmide PTZ-V<sub>L</sub>D7C2 décrit à l'exemple 1 ci-dessus, qui porte la région  
10 variable de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal IgM-D7C2 ;

- une amorce représentant une séquence consensus à l'extrémité 5' des gènes V<sub>L</sub> humains (OPP-HuV $\lambda$ 5'), et une autre amorce complémentaire de la région  
15 5' de la séquence codant pour la région constante lambda (OPP-HuV $\lambda$ 3'), et qui permet d'amplifier toute région variable de chaîne  $\lambda$ ).

Ces amorces apportent en outre respectivement les sites de restriction enzymatiques SacI et XhoI.

20 Les séquences nucléotidiques de ces amorces sont les suivantes :

\* OPP-HuV $\lambda$ 5' (SEQ ID NO : 20) :  
5' -CA(GC)TCTGAGCTCAG(GT)CAG- 3'  
(site SacI souligné)

25 L'utilisation de cette amorce provoque la modification de la séquence Gln-Ser-Val des trois premiers aminoacides de la charpente 1 de l'anticorps parental IgM-D7C2 en Asp-Ile-Glu dans l'anticorps recombinant.

30 \* OPP-HuV $\lambda$ 3' (SEQ ID NO : 21) :  
5' -TTGAAGCTCGAGGGAGGGCGGGAA- 3'  
(site XhoI souligné)

La composition du mélange d'amplification est la suivante :

35 10  $\mu$ l de tampon 10X de l'ADN polymérase ;  
100 ng de plasmide PPTZ-V<sub>L</sub>D7C2 ; 4  $\mu$ l du mélange de

déoxynucléotides (mélange contenant 5 mM dATP + 5 mM dCTP + 5 mM dGTP + 5 mM dTTP, BOEHRINGER) ; 2 mM MgSO<sub>4</sub> ; 1000 pmoles de l'amorce OPP-HuV $\lambda$ 5' et 200 pmoles de l'amorce OPP-HuV $\lambda$ 3' ; 1  $\mu$ l d'ADN polymérase thermostable, et eau distillée q.s.p. 100  $\mu$ l.

L'amplification a été réalisée en 30 cycles successifs d'incubation à 95°C pendant 30 secondes, 40°C pendant 30 secondes, et 72°C pendant 30 secondes, puis a été suivie d'une incubation à 72°C pendant 10 minutes.

L'amplification a permis d'obtenir un fragment d'environ 360 pb contenant la région variable V<sub>L</sub> de l'anticorps D7C2 ainsi que la séquence codant pour les 16 premiers acides aminés de la région constante humaine  $\lambda$ .

Après amplification de la région V<sub>L</sub>, une digestion par les enzymes SacI et XhoI du produit d'amplification a été réalisée et le fragment obtenu a été inséré entre les sites SacI et XhoI du plasmide pBC $\lambda$  pour donner le plasmide pB $\lambda$ D7C2. La composition du mélange de ligation est la suivante :

2  $\mu$ l de tampon 10X pour la T4-DNA ligase (BOEHRINGER) ; 100 ng du fragment V<sub>L</sub>D7C2 traité par les enzymes SacI et XhoI, 1  $\mu$ l du plasmide pBC $\lambda$  coupé par SacI et XhoI ; 1  $\mu$ l de ligase (1 unité), et eau distillée q.s.p. 20  $\mu$ l.

L'incubation est effectuée à 16°C pendant 8 heures puis le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* compétentes.

Les étapes de construction du plasmide pB $\lambda$ D7C2 sont représentées à la Figure 1.

La séquence de l'insert du plasmide pB $\lambda$ D7C2 qui code pour la chaîne légère lambda d'un anticorps r-D7C2, et pour le peptide signal, est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID N°: 5 ; la séquence polypeptidique de la chaîne légère lambda codée par cet insert est représentée sous le numéro SEQ ID N°: 6.

B) PLASMIDE DE TRANSFERT POUR LA CHAÎNE LOURDE1) Obtention du plasmide pBCyl

## a- Plasmide de transfert :

Le plasmide pGm16 [BLANC et al, Virology, 192, 651-654, (1993)] dérive d'un plasmide dans lequel a été cloné le fragment EcoRI-P du baculovirus AcMNPV contenant le gène p10. La quasi-totalité de la séquence codante a été délétée et remplacée par un site BglII permettant l'insertion de séquences à exprimer sous le contrôle du promoteur p10.

## b- Peptide signal :

La séquence codante de ce peptide est celle d'un gène VH de souris (NEUBERGER M.S., 1983. EMBO J, 2, 1373-1378).

Elle a été synthétisée chimiquement sous forme de brins complémentaires, de manière à ce qu'elle puisse être insérée dans un site BglII (Figure 1). Les conditions d'appariement et de ligation sont identiques à celles utilisées pour la chaîne légère.

## c- Régions constantes humaines (Cyl):

Le cDNA de la séquence codante de la région Cyl humaine a été amplifié par ACP en utilisant les amorces suivantes :

\*HuCylBAC (SEQ ID NO : 22) :

5' CAA GGT ACC ACG GTC ACC GTC TCC - 3'

(site KpnI souligné).

Cette amorce correspond à une séquence consensus des régions JH murines (extrémités 3' des régions variables des chaînes lourdes murines), et comprend un site KpnI.

\*HuCylFOR (SEQ ID NO : 23) :

5'-GAAGATC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA G-3'

(site BglII souligné).

La séquence a été déterminée à partir de séquences Cyl humaines. L'amorce est complémentaire de l'extrémité 3' des Cyl humaines, et permet de reconstituer après amplification un site BglII en aval du codon stop.

La matrice utilisée pour amplifier la région C $\gamma$ 1 humaine est le même mélange d'ADNc que celui utilisé pour l'amplification des séquences codantes C $\lambda$

Le produit d'amplification a été séquencé et  
5 cloné dans le vecteur de transfert pGm16 portant la séquence codant pour le peptide signal. La construction obtenue a été appelée pBC $\gamma$ 1.

2) Clonage de la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps D7C2

10 Le clonage de la région variable V $_H$  de la chaîne lourde de l'anticorps D7C2 a été réalisé de la manière suivante :

La région variable V $_H$  de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal IgM-D7C2 a été amplifiée par ACP  
15 en utilisant :

- comme matrice l'ADN du plasmide PTZ-V $_H$ D7C2 portant la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal IgM-D7C2,

- une amorce reconstituant l'extrémité 5' des  
20 régions variables de la famille VH4 (OC15-HuVH4) et une seconde amorce complémentaire de la partie 3' des gènes JH humains (OPP-HuJH). Ces amorces apportent respectivement les sites de restriction enzymatiques PstI et KpnI.

25 Les séquences nucléotidiques de ces amorces sont les suivantes :

\* OC15-HuVH4 (SEQ ID NO : 24) :

5' - GTC CAA CTG CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG  
TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC - 3'

30 (le site PstI est souligné)

Cette amorce a été déterminée pour reconstituer la séquence codant pour les 14 premiers acides aminés de la charpente 1 des régions variables de la famille VH4 des chaînes  $\lambda$ 1 humaines, qui manquait dans  
35 le plasmide PTZ-V $_H$ D7C2.

\* OPP-HuJH (SEQ ID NO : 25) :

5'- TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT ACC TTG GC- 3'

(Le site KpnI est souligné).

Cette amorce est complémentaire de la séquence  
5 consensus à l'extrémité 3' des régions JH humaines et  
comprend un site KpnI

La composition du mélange d'amplification est  
la suivante :

10 µl de tampon 10X de l'ADN polymérase, 100  
10 ng de plasmide PTZ-V<sub>H</sub>D7C2, 4 µl du mélange de  
déoxynucléotides (mélange contenant 5 mM dATP + 5 mM dCTP  
+ 5 mM dGTP + 5 mM dTTP, BOEHRINGER), 75 pmoles de  
l'amorce OC15-HuVH4 et 100 pmoles de l'amorce OPP-HuJH,  
1µl de DNA polymérase thermostable et eau distillée  
15 q.s.p. 100 µl.

L'amplification a été effectuée en 30 cycles  
successifs d'incubation à 95°C pendant 30 secondes, 55°C  
pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes et a été  
suivie d'une incubation à 72°C pendant 10 minutes.

20 Après amplification de la région V<sub>H</sub>D7C2, une  
digestion Pst I-KpnI du fragment d'amplification obtenu  
(taille environ 360 pb) a été réalisée et le fragment  
obtenu a été inséré entre les sites PstI et KpnI du  
plasmide cassette chaîne lourde pBC<sub>γ</sub>1 pour donner le  
25 plasmide chargé pB<sub>γ</sub>1D7C2.

La composition du mélange de ligation est la  
suivante :

2 µl de tampon 10X de la ligase (BOEHRINGER),  
20 ng du fragment V1D7C2 traité par les enzymes PstI et  
30 KpnI, 500 ng du plasmide pBC<sub>λ</sub>1 coupé par PstI et KpnI,  
1µl de ligase (BOEHRINGER) et eau distillée q.s.p. 20 µl.

La ligation et la transformation des bactéries  
*E. coli* compétentes sont effectuées comme décrit  
ci-dessus.

35 Les étapes de construction du plasmide  
pB<sub>γ</sub>1D7C2 sont représentées à la Figure 2.



La séquence de l'insert du plasmide pBy1D7C2 qui code pour la chaîne lourde gamma 1 d'un anticorps r-IgG-D7C2, et pour le peptide signal, est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro  
5 SEQ ID N°: 5 ; la séquence polypeptidique de la chaîne lourde gamma 1 codée par cet insert est représentée sous le numéro SEQ ID N°: 6.

**Exemple 3 : Construction d'un baculovirus recombinant produisant l'anticorps r-D7C2**

10 a - Insertion de la chaîne légère

Le plasmide chargé pB $\lambda$ D7C2 a été utilisé pour co-transfecter des cellules d'insecte avec de l'ADN du baculovirus sauvage AcMNPV.

Les conditions de transfection sont les  
15 suivantes : 500 ng d'ADN viral et 4  $\mu$ g d'ADN plasmidique en présence de 40  $\mu$ l de DOTAP (BOEHRINGER) dans 3 ml de milieu de culture sans sérum de veau pour cellules d'insectes. La cotransfection a été réalisée sur  $4 \times 10^6$  cellules d'insectes Sf9 (ATCC35CRL 1711). Après quatre  
20 heures de contact à 28°C, le mélange de cotransfection est remplacé par 4 ml de milieu de TGV5 (milieu complet pour cellules d'insectes avec 5% de sérum de veau). La culture est continuée pendant 6 jours à 28°C.

Le virus produisant la chaîne légère de  
25 l'anticorps r-IgG-D7C2 sous le contrôle du promoteur polyédrique a été sélectionné dans un premier temps sur son incapacité à produire des polyèdres, puis sur sa capacité à exprimer une chaîne légère d'environ 25 kDa détectable par Western blot à l'aide d'anticorps anti-  
30 chaîne  $\lambda$  humaine du commerce (CALTAG, TEBU).

L'ADN du virus recombinant obtenu (appelé AcMNPV- $\lambda$ D7C2) a été préparé à partir des surnageants de cellules infectées.

b - Insertion de la chaîne lourde

35 Le plasmide chargé pBy1D7C2 a été utilisé en cotransfection avec l'ADN du baculovirus modifié AcMNPV- $\lambda$

D7C2. La cotransfection a été réalisée avec 500 ng d'ADN viral et 5 µg d'ADN plasmidique, sur cellules Sf9. Les doubles recombinants ont été sélectionnés par la technique de la dilution limite, associée à la technique  
5 ELISA.

Après une semaine de culture, le surnageant de cotransfection est dilué ( $10^{-4}$  à  $10^{-10}$ ) puis distribué en plaques de 96 puits sur des cellules Sf9 (100 µl de surnageant/puits), après une heure de contact, 100 µl de  
10 milieu sont rajoutés dans chaque puits. La sécrétion d'immunoglobulines γ1 est recherchée dans le surnageant de chaque puits par ELISA après une semaine de culture à 28°C.

Le test ELISA est réalisé comme indiqué ci-  
15 dessous :

50 µl de surnageant de culture de chaque puits sont déposés sur une plaque ELISA (NUNC) recouverte d'anticorps anti-IgG humaines totales (CALTAG, TEBU). L'adsorption des anticorps anti-IgG (100 µl d'une  
20 dilution 1/2000 par puits) a été réalisée en tampon PBS (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pendant une nuit à 4°C, après une saturation préalable pendant une heure à 37°C avec du PBS additionné de 5% de sérum de veau. Après l'ajout des surnageants de  
25 culture, 50 µl de PBS additionné de 1% de sérum de veau et 0,1% de Tween 20 sont rajoutés dans chaque puits. L'ensemble est incubé à 37°C et trois lavages en PBS additionné de 1% de Tween 20 sont effectués. Les plaques sont recouvertes d'anticorps anti-IgG humaines couplés à  
30 la biotine (CALTAG), à raison de 100 µl/puits d'une dilution 1/10 000 faite dans du PBS additionné de 1% de sérum de veau et 0,1% de Tween 20, pendant une heure à 37°C. Après trois nouveaux lavages, les plaques sont incubées en présence du conjugué streptavidine/  
35 phosphatase alcaline (dilution 1/10 000, CALTAG) puis révélées par le substrat p-nitrophényl-phosphate (1mg/ml,

SIGMA) dilué en tampon alcalin (9 volumes de solution NaCl 3M et 1 volume de tampon Tris-HCl 1M pH 9,6). La densité optique de chaque puits est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm. Les surnageants des puits  
5 positifs aux dilutions virales les plus fortes sont recueillis et conservés.

L'isolement d'un clone viral recombinant exprimant la chaîne légère et la chaîne lourde est assuré par deux autres séries d'infections en plaques de 96  
10 puits et recherche de l'anticorps par ELISA, suivies d'un clonage par la technique des plages de lyse. Le virus sélectionné a été baptisé Ac10HRh-33LRh (313).

**Exemple 4 : Production et purification de l'anticorps monoclonal recombinant r-IgG-D7C2**

15 **a) Culture et purification**

Le virus sélectionné Ac10HRh-33LRh (313) est multiplié sur cellules d'insectes Sf9 en milieu TGV2 (2% de sérum de veau foetal). La concentration d'anticorps produit et sécrété est évaluée par ELISA ; elle est  
20 d'environ 3 mg/l.

Une fraction du surnageant viral obtenu est concentrée 10 fois à l'aide de concentrateurs CENTRIPREP 30 (AMICON), à une vitesse de rotation de 1800 tours par minute. Ce concentré est directement utilisé pour les  
25 tests d'activité biologique in vitro. La concentration d'anticorps recombinant est évaluée à 30 mg/l dans le concentré.

D'autre part, une fraction (50 ml) de surnageant viral est déposée sur une colonne de  
30 chromatographie de protéine A (gel SEPRACOR) préalablement équilibrée avec du PBS, afin de purifier l'IgG1 recombinante. Après deux rinçages successifs de la colonne avec du PBS et une solution citrate/acide citrique 0,1M pH5, l'immunoglobuline est éluée avec une  
35 solution citrate/acide citrique 0,1M pH3. L'élution est suivie en mesurant la DO à 280 nm. Enfin, les fractions

recueillies sont neutralisées à pH7 avec une solution de Tris-HCl pH8 et conservées à 4°C. La solution d'anticorps purifié est testée pour l'activité biologique parallèlement à la solution concentrée.

5                    b) Contrôle de l'assemblage et de la taille des chaînes d'immunoglobuline

La qualité de l'anticorps produit par le virus recombinant Ac 10HRh-33LRh(313) a été contrôlée par migration électrophorétique dans un gel SDS-PAGE 12,5% en  
10 utilisant comme témoin une IgGλ humaine monoclonale du commerce (SIGMA). Cette expérience a montré que l'anticorps humain non réduit migre au même niveau que l'anticorps humain témoin. Après réduction par le dithiotréitol (DTT), on observe l'apparition de deux  
15 sous-unités correspondant aux chaînes lourdes et légères, et migrant au même niveau que les chaînes de l'anticorps humain contrôle traité de la même façon.

Pour confirmer ces résultats, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose,  
20 et les chaînes lourde et légère ont été détectées par des anticorps spécifiques anti-IgG ou anti-λ humaines.

**Exemple 5 : Activité biologique de l'anticorps monoclonal recombinant r-IgG-D7C2**

L'activité biologique de l'anticorps  
25 recombinant a été mesurée en utilisant le surnageant de culture des cellules d'insectes productrices de r-IgG-D7C2, concentré 10 fois. Les mesures ont été effectuées par rapport à un anticorps recombinant (IgG1,κ) "non-pertinent" (irrelevant) dirigé contre une protéine autre  
30 que l'antigène Rhésus (contrôle négatif) et produit dans les mêmes conditions en cellules d'insectes, et par rapport à l'anticorps monoclonal parental humain IgM-D7C2 (IgM,λ).

L'activité biologique de l'anticorps  
35 recombinant r-IgG-D7C2 a été évaluée :

1° Par des tests d'agglutination en tubes, avec le surnageant des cultures de cellules d'insectes concentré 10 fois (30µg/ml) et un panel de globules rouges humains papainés Rh-positif (R1/r, R1/R1, R2/R2, Ro/r), et Rh-négatif (r/r) (G.N.R.G.S.).

50 µl de surnageant de culture concentré, contenant r-IgG-D7C2, et 50 µl de la suspension à 2% de globules rouges ont été incubés pendant 45 minutes à 37° ; les agglutinations sont appréciées de + à +++ selon l'intensité de la réaction.

Les résultats figurent dans le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

15 GLOBULES ROUGES PAPAINES	R1/r	R1/R1	R2/R2	Ro/r	r/r
20 INTENSITE	+	+	+++	++	-

Le titre de l'anticorps recombinant r-IgG-D7C2, estimé en incubant le surnageant avec un pool de globules rouges R1/r, traité à la papaïne, pendant une heure à 37°C est de 1/512ème.

2° Par un test d'ADCC :

\* Cellules effectrices (lymphocytes humains) :

25 La couche mononuclée est récupérée à partir du sang périphérique hépariné et séparé sur gradient de Ficoll Hypaque. Les cellules sont incubées à 37°, pendant une nuit, dans une boîte de culture cellulaire en plastique (pour supprimer les monocytes) avec 1% de sérum de veau foetal ; les cellules non adhérentes sont ensuite

30 récupérées et utilisées pour le test de cytotoxicité à raison de  $8 \times 10^6$  cellules/ml.

\* Cellules cibles (globules rouges)

- Le sang veineux de donneurs normaux, de

35 groupe R1/R1 (Rhésus positif) et de groupe r/r (Rhésus

négatif), est prélevé sur citrate, puis les globules sont mis en suspension à 2% dans du NaCl et papainés.

- Marquage au chrome Cr<sup>51</sup>

20 x 10<sup>6</sup> globules rouges papainés sont incubés à 37° pendant une heure avec 200µCi de Cr<sup>51</sup>, lavés 4 fois et resuspendus dans du NaCl à 9 pour mille.

- Test ADCC

Les expériences sont effectuées en triple, incluant les combinaisons suivantes :

10 . globules rouges marqués au Cr<sup>51</sup> suspendus dans du NaCl à 9 pour mille, pour mesurer le relargage spontané du chrome.

15 . globules rouges marqués au Cr<sup>51</sup>, suspendus dans de l'eau distillée pour mesurer le relargage maximum du chrome.

. globules rouges marqués au Cr<sup>51</sup> sans anticorps, pour mesurer la cytotoxicité éventuelle des cellules effectrices.

20 . globules rouges marqués au Cr<sup>51</sup>, sensibilisés avec :

- l'anti-D recombinant r-IgG-D7C2 ;

- un anticorps anti-D polyclonal spécifique (gammaglobulines, CNTS) à titre de contrôle positif ;

25 - l'anticorps recombinant "non-pertinent", à titre de contrôle négatif.

Les anticorps sont utilisés à deux concentrations différentes (7,5µg/ml, 3,5µg/ml).

30 Les cellules préparées, effectrices et cibles sont distribuées dans des microplaques à fond rond de la manière suivante :

50 µl de lymphocytes (8.10<sup>6</sup> cellules/ml) et 50 µl de la suspension de globules rouges marqués au Cr<sup>51</sup> (8.10<sup>5</sup> cellules/ml) sont mis dans chaque puits avec un ratio de 10/1 ; 50 µl des différents anticorps sont ajoutés ensuite pour l'étude comparative.

La quantité de  $\text{Cr}^{51}$  relargué est mesurée pour chaque suspension de globules rouges, et le % de lyse spécifique est calculé selon la formule suivante :

$$5 \quad \frac{(\% \text{ relargage d'un test}) - (\% \text{ relargage spontané})}{(\% \text{ relargage maximum}) - (\% \text{ relargage spontané})} \times 100$$

Les résultats figurent sur les tableaux II (hématies R1/R1) et III (hématies r/r) ci-dessous.

TABLEAU II

10		Concentration d'anticorps	% de Lyse spécifique
	Lymphocytes + Hématies		0,65%
15	Lymphocytes + Hématies + Anticorps témoin (IgG1) recombinant	3,5 µg/ml	0%
	Lymphocytes + Hématies	7,5 µg/ml	76,6%
20	+ r-IgG-D7C2	3,5 µg/ml	93,3%
	Lymphocytes + Hématies + Anti-D polyclonal (γ globulines)	7,5 µg/ml	66,9%
		3,5 µg/ml	76,0%

TABLEAU III

		Concentration d'anticorps	% de Lyse spécifique
5	Lymphocytes + Hématies		0,76%
	Lymphocytes + Hématies + Anticorps témoin (IgG1) recombinant	3,5 µg/ml	0%
10	Lymphocytes + Hématies + r-IgG-D7C2	7,5 µg/ml 3,5 µg/ml	1,3% 0%
15	Lymphocytes + Hématies + Anti-D polyclonal (γ globulines)	7,5 µg/ml 3,5 µg/ml	0% 0,1%

Ces résultats montrent que l'anticorps r-IgG-D7C2 induit une lyse spécifique des hématies Rh-positif R1/R1.



## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT PASTEUR
  - (B) RUE: 28, RUE DU DOCTEUR ROUX
  - (C) VILLE: PARIS
  - (D) ETAT OU PROVINCE: -
  - (E) PAYS: FRANCE
  - (F) CODE POSTAL: 75724 CEDEX 15
- 
- (A) NOM: PROTEINE PERFORMANCE - SOCIETE ANONYME
  - (B) RUE: ROUTE D'ALES
  - (C) VILLE: SAINT CHRISTOL-LES-ALES
  - (D) ETAT OU PROVINCE: -
  - (E) PAYS: FRANCE
  - (F) CODE POSTAL: 30380
- 
- (A) NOM: EDELMAN LENA
  - (B) RUE: 6 RUE FESSART
  - (C) VILLE: BOULOGNE
  - (D) ETAT OU PROVINCE: -
  - (E) PAYS: FRANCE
  - (F) CODE POSTAL: 92100
- 
- (A) NOM: MARGARITTE CHRISTEL
  - (B) RUE: 16 RUE CHARLES DE GAULLE
  - (C) VILLE: CHATENAY-MALABRY
  - (D) ETAT OU PROVINCE: -
  - (E) PAYS: FRANCE
  - (F) CODE POSTAL: 92290
- 
- (A) NOM: KACZORECK MICHEL
  - (B) RUE: 81 BOULEVARD DE LA LIRONDE
  - (C) VILLE: MONTFERRIER
  - (D) ETAT OU PROVINCE: -
  - (E) PAYS: FRANCE
  - (F) CODE POSTAL: 34980
- 
- (A) NOM: CHAABIHI HASSAN
  - (B) RUE: 30B AVENUE JULES GUESDE
  - (C) VILLE: ALES
  - (D) ETAT OU PROVINCE: -
  - (E) PAYS: FRANCE
  - (F) CODE POSTAL: 30100

(ii) TITRE DE L' INVENTION: OBTENTION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL RECOMBINANT A PARTIR D'UN ANTICORPS MONOCLONAL HUMAIN ANTI-RHESUS D, SA PRODUCTION EN CELLULES D'INSECTE, ET SES UTILISATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 25

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 312 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMBLEMENT: 1..312  
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "Immunoglobulin Variable Region"

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: misc\_feature  
 (B) EMBLEMENT: 67..99  
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /label= CDR1

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: misc\_feature  
 (B) EMBLEMENT: 145..165  
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /label= CDR2

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: misc\_feature  
 (B) EMBLEMENT: 262..279  
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /label= CDR3

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAC ATC GAG CTC ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG	48
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln	
1 5 10 15	
ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA ACC TAT TAT GCA	96
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Thr Tyr Tyr Ala	
20 25 30	
AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCA CCT GTA CTT GTC ATC TAT	144
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr	
35 40 45	
GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC	192
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA	240
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu	
65 70 75 80	
GAT GAG GCT GAC TAT TTC TGT AAC AGC GGT GGG AAG GTG TTC GGC GGA	288
Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Asn Ser Gly Gly Lys Val Phe Gly Gly	
85 90 95	
GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT	312
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
100	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 104 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1           5           10           15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Thr Tyr Tyr Ala
          20           25           30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35           40           45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65           70           75           80
Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Asn Ser Gly Gly Lys Val Phe Gly Gly
          85           90           95
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100

```

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 369 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 1..369
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "Immunoglobulin Variable Region"

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_feature
- (B) EMBLEMENT: 91..105
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /label= CDR1

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_feature
- (B) EMBLEMENT: 148..195
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /label= CDR2

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc\_feature
- (B) EMBLEMENT: 292..336
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /label= CDR3

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CAG GTC CAA CTG CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu 105 110 115 120	48
ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr 125 130 135	96
TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 140 145 150	144
GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys 155 160 165	192
AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu 170 175 180	240
AAA CTG AAC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 185 190 195 200	288
AGG GCC CCA GAG TAT AAA TGG AAG TAT CAT GGG GAC TGG TTC GAC CCC Arg Ala Pro Glu Tyr Lys Trp Lys Tyr His Gly Asp Trp Phe Asp Pro 205 210 215	336
TGG GGC CAA GGT ACC ACT GTC ACC GTC TCC TCA Trp Gly Gln Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 220 225	369

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 123 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu 1 5 10 15	
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr 20 25 30	
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45	
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys 50 55 60	
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu 65 70 75 80	
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95	

Arg Ala Pro Glu Tyr Lys Trp Lys Tyr His Gly Asp Trp Phe Asp Pro  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 716 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 1..716

(ix) CARACTERISTIQUE:

- CHARACTERISTICS:  
(A) NOM/CLE: sig\_peptide  
(B) EMPLACEMENT:1..57

(ix) CARACTERISTIQUE:

- CHARACTERISTIQUES:
- (A) NOM/CLE: mat\_peptide
  - (B) EMBLACEMENT: 58..716
  - (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "Immunoglobulin, Light Chain"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

ATG Met -19	GGA Gly	TGG Trp	AGC Ser	TGT Cys -15	ATC Ile	ATC Ile	CTC Leu	TTC Phe	TTG Leu -10	GTA Val	GCA Ala	ACA Thr	GCT Ala	ACA Thr -5	GGT Gly	48
GTC Val	CAC His	TCC Ser	GAC Asp 1	ATC Ile	GAG Glu	CTC Leu	ACT Thr 5	CAG Gln	GAC Asp	CCT Pro	GCT Ala	GTG Val 10	TCT Ser	GTG Val	GCC Ala	96
TTG Leu 15	GGA Gly	CAG Gln	ACA Thr	GTC Val	AGG Arg	ATC Ile 20	ACA Thr	TGC Cys	CAA Gln	GGA Gly	GAC Asp 25	AGC Ser	CTC Leu	AGA Arg	ACC Thr	144
TAT Tyr 30	TAT Tyr	GCA Ala	AGC Ser	TGG Trp	TAC Tyr 35	CAG Gln	CAG Gln	AAG Lys	CCA Pro	GGA Gly 40	CAG Gln	GCA Ala	CCT Pro	GTA Val	CTT Leu 45	192
GTC Val	ATC Ile	TAT Tyr	GGT Gly	AAA Lys 50	AAC Asn	AAC Asn	CGG Arg	CCC Pro	TCA Ser 55	GGG Gly	ATC Ile	CCA Pro	GAC Asp	CGA Arg 60	TTC Phe	240
TCT Ser	GGC Gly	TCC Ser	AGC Ser 65	TCA Ser	GGA Gly	AAC Asn	ACA Thr	GCT Ala 70	TCC Ser	TTG Leu	ACC Thr	ATC Ile	ACT Thr 75	GGG Gly	GCT Ala	288
CAG Gln	GCG Ala	GAA Glu 80	GAT Asp	GAG Glu	GCT Ala	GAC Asp	TAT Tyr 85	TTC Phe	TGT Cys	AAC Asn	AGC Ser	GGT Gly 90	GGG Gly	AAG Lys	GTG Val	336
TTC Phe 95	GGC Gly	GGA Gly	GGG Gly	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu 100	ACC Thr	GTC Val	CTA Leu	GGT Gly	CAG Gln 105	CCC Pro	AAG Lys	GCT Ala	GCC Ala	384

CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC	CTC	GAG	GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	432
Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	
110					115					120					125	
AAG	GCC	ACA	CTC	GAG	GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTA	GTG	TGT	480
Lys	Ala	Thr	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	
				130					135					140		
CTG	ATC	AGT	GAC	TTC	TAC	CCG	GGA	GCT	GTG	ACA	TTG	GCT	TGG	AAG	GCA	528
Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	Trp	Lys	Ala	
			145				150						155			
GAT	GGC	AGG	CCC	GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	AAC	AAA	CCC	TCC	AAA	576
Asp	Gly	Arg	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	
		160				165						170				
CAG	AGC	AAC	AAC	AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAC	CTG	AGC	CTG	ACG	CCC	624
Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	
	175					180					185					
GAG	CAG	TGG	AAG	TCC	CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	672
Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	
190					195					200					205	
GGG	AGC	ACT	GCA	GAG	AAG	ACG	GTG	GCC	CCT	GCA	GAA	TGT	TCA	TA		716
Gly	Ser	Thr	Ala	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser			
				210					215							

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 238 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	
-19				-15					-10						-5	
Val	His	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	
			1				5					10				
Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Thr	
	15				20					25						
Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	
30					35					40				45		
Val	Ile	Tyr	Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	
				50					55					60		
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	
			65				70						75			
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Asn	Ser	Gly	Gly	Lys	Val	
	80					85					90					
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	
	95					100					105					
Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	
110					115					120					125	



TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln 65 70 75	288
TTC TCC CTG AAA CTG AAC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr 80 85 90	336
TAC TGT GCG AGG GCC CCA GAG TAT AAA TGG AAG TAT CAT GGG GAC TGG Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Glu Tyr Lys Trp Lys Tyr His Gly Asp Trp 95 100 105	384
TTC GAC CCC TGG GGC CAA GGT ACC ACT GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 110 115 120 125	432
ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr 130 135 140	480
TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro 145 150 155	528
GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val 160 165 170	576
CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser 175 180 185	624
AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile 190 195 200 205	672
TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GCA Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala 210 215 220	720
GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala 225 230 235	768
CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro 240 245 250	816
AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val 255 260 265	864
GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val 270 275 280 285	912
GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln 290 295 300	960
TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC AAA GTC CTG CAC CAG Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Lys Val Leu His Gln 305 310 315	1008



GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC	1056
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
320 325 330	
CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC	1104
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
335 340 345	
CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC	1152
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr	
350 355 360 365	
AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC	1200
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
370 375 380	
GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC	1248
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
385 390 395	
AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC	1296
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
400 405 410	
AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC	1344
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
415 420 425	
TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG	1392
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
430 435 440 445	
AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TG	1418
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
450	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 472 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-19 -15 -10 -5	
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys	
1 5 10	
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe	
15 20 25	
Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	
30 35 40 45	
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro	
50 55 60	
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln	
65 70 75	

Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
 80 85 90  
 Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Glu Tyr Lys Trp Lys Tyr His Gly Asp Trp  
 95 100 105  
 Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 110 115 120 125  
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 145 150 155  
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 160 165 170  
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 175 180 185  
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 190 195 200 205  
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala  
 210 215 220  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 225 230 235  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 240 245 250  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 255 260 265  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 270 275 280 285  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Lys Val Leu His Gln  
 305 310 315  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 320 325 330  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 335 340 345  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 350 355 360 365  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 370 375 380  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 385 390 395  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 400 405 410  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 415 420 425

41

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 430 435 440 445  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCTCAGTGAA GGTCTCCTGC AAGG

24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

TCCTGCGCTG GTGAAAGCCA CACA

24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GGTCCCTGAG ACTCTCCTGT GCA

23

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 25 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TCGGAGACCC TGTCCCTCAC CTGCA

25

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:  
CGCTGTCTCT GGTACTCCA TCAG 24
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:  
GAAAAAGCCC GGGGAGTCTC TGAA 24
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:  
CCTGTGCCAT CTCGGGGAC AGTG 24
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:  
CAGTCTGTGC TGA CTCAG 18
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:  
CACACYAGTG TRGCCTGGTT 20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

CCTGTCAGAT CTATGAACAT TCTGTAGGGG

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CCGCCCTCCC TCGAGCTTCA A

21

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

CASTCTGAGC TCACKCAG

18

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

TTGAAGCTCG AGGGAGGGCG GGAA

24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

CAAGGTACCA CGGTCACCGT CTCC

24

44

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 29 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

GAAGATCTCA TTTACCCGGA GACAGGGAG

29

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 57 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

GTCCAAGTGC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTC

57

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 29 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

TGAGGAGACC GTGACCGTGG TACCTTGGC

29

## REVENDECATIONS

1) Fragment d'ADN, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par :

5 - un fragment d'ADN qui code pour le domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal D7C2 ;

- un fragment d'ADN qui code pour le domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal D7C2.

10 2) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment d'ADN selon la revendication 1, placé sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur de baculovirus.

15 3) Cassette d'expression selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend les éléments permettant l'expression de la chaîne lourde ou de la chaîne légère d'un anticorps monoclonal recombinant dénommé r-D7C2, lesdits éléments étant constitués par :

20 - un promoteur de baculovirus, sous contrôle transcriptionnel duquel sont placés :

- une séquence codant pour un peptide signal de sécrétion ; et

25 - une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal D7C2 et une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère d'une immunoglobuline ; ou bien

30 - une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal D7C2 et une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne lourde d'une immunoglobuline.

35 4) Cassette d'expression selon la revendication 2, caractérisée en ce que la séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère ou de la chaîne lourde d'immunoglobuline est une séquence d'origine humaine.

5) Cassette d'expression selon une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que le promoteur de baculovirus est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés, ou bien le promoteur de la p10 ou l'un de ses dérivés.

6) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'ADN selon la revendication 1.

7) Vecteur recombinant selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 2 à 5.

8) Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il constitue un vecteur de transfert, portant un insert comprenant : une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 2 à 4, et de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome de baculovirus en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

9) Vecteur de transfert selon la revendication 8, caractérisé en ce que lesdites séquences de baculovirus sont homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine.

10) Vecteur de transfert selon la revendication 9, caractérisé en ce que la cassette d'expression contenant le gène codant pour la chaîne légère de l'anticorps r-D7C2 est flanquée des régions entourant le gène de la polyédrine dans le baculovirus sauvage, et la cassette d'expression portant le gène codant pour la chaîne lourde de l'anticorps r-D7C2 est flanquée des régions entourant le gène P10 dans le baculovirus sauvage.



11) Baculovirus recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 2 à 5.

12) Baculovirus recombinant selon la  
5 revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne H de l'anticorps r-D7C2, et une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne L de l'anticorps r-D7C2.

10 13) Baculovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce que le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne L de l'anticorps monoclonal r-D7C2, et le promoteur contrôlant la transcription de la séquence  
15 codant pour la chaîne H de l'anticorps monoclonal r-D7C2, sont deux promoteurs différents.

14) Baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'un desdits promoteurs est situé à l'emplacement occupé chez le  
20 baculovirus sauvage, par le promoteur de la polyédrine et l'autre est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.

15) Baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce  
25 que la transcription de la séquence codant pour la chaîne légère de l'anticorps r-D7C2 est sous contrôle du promoteur de la polyédrine ou de l'un de ses dérivés, et la transcription de la séquence codant pour la chaîne lourde de l'anticorps r-D7C2 est sous contrôle du  
30 promoteur de la P10 ou de l'un de ses dérivés.

16) Baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que la séquence codant pour le peptide signal associé à la chaîne L de l'anticorps monoclonal r-D7C2, et la  
35 séquence codant pour le peptide signal associé à la

chaîne H de l'anticorps monoclonal r-D7C2, sont deux séquences différentes.

17) Baculovirus recombinant selon la revendication 16, déposé le 19 août 1994, auprès de la C.N.C.M., sous le numéro I-1468.

18) Cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 11 à 17.

19) Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle l'on cultive des cellules d'insecte selon la revendication 18, et une étape au cours de laquelle l'on obtient ledit anticorps à partir du milieu de culture.

20) Anticorps monoclonal recombinant, caractérisé en ce que ses domaines variables ont la séquence des domaines variables de l'anticorps monoclonal D7C2.

21) Anticorps monoclonal recombinant selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 19.

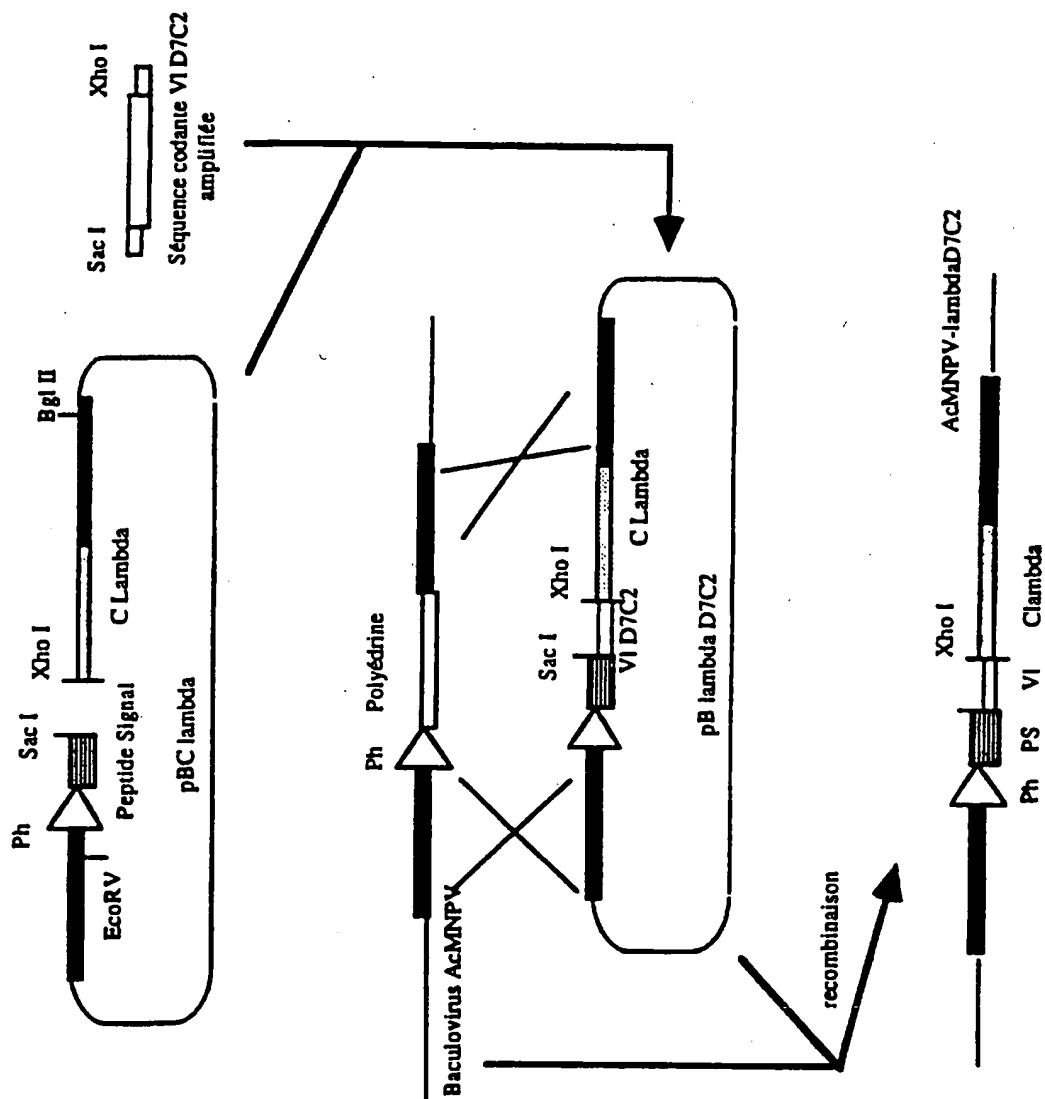
22) Anticorps monoclonal recombinant selon une quelconque des revendications 20 ou 21 caractérisé en ce que la séquence polypeptidique de sa chaîne légère et la séquence polypeptidique de sa chaîne lourde sont des séquences humaines.

23) Anticorps monoclonal recombinant selon une quelconque des revendications 20 à 22 caractérisé en ce qu'il appartient à la classe des IgG.

24) Utilisation d'un anticorps monoclonal recombinant selon une quelconque des revendications 20 à 23 pour l'obtention de médicaments.

1/2

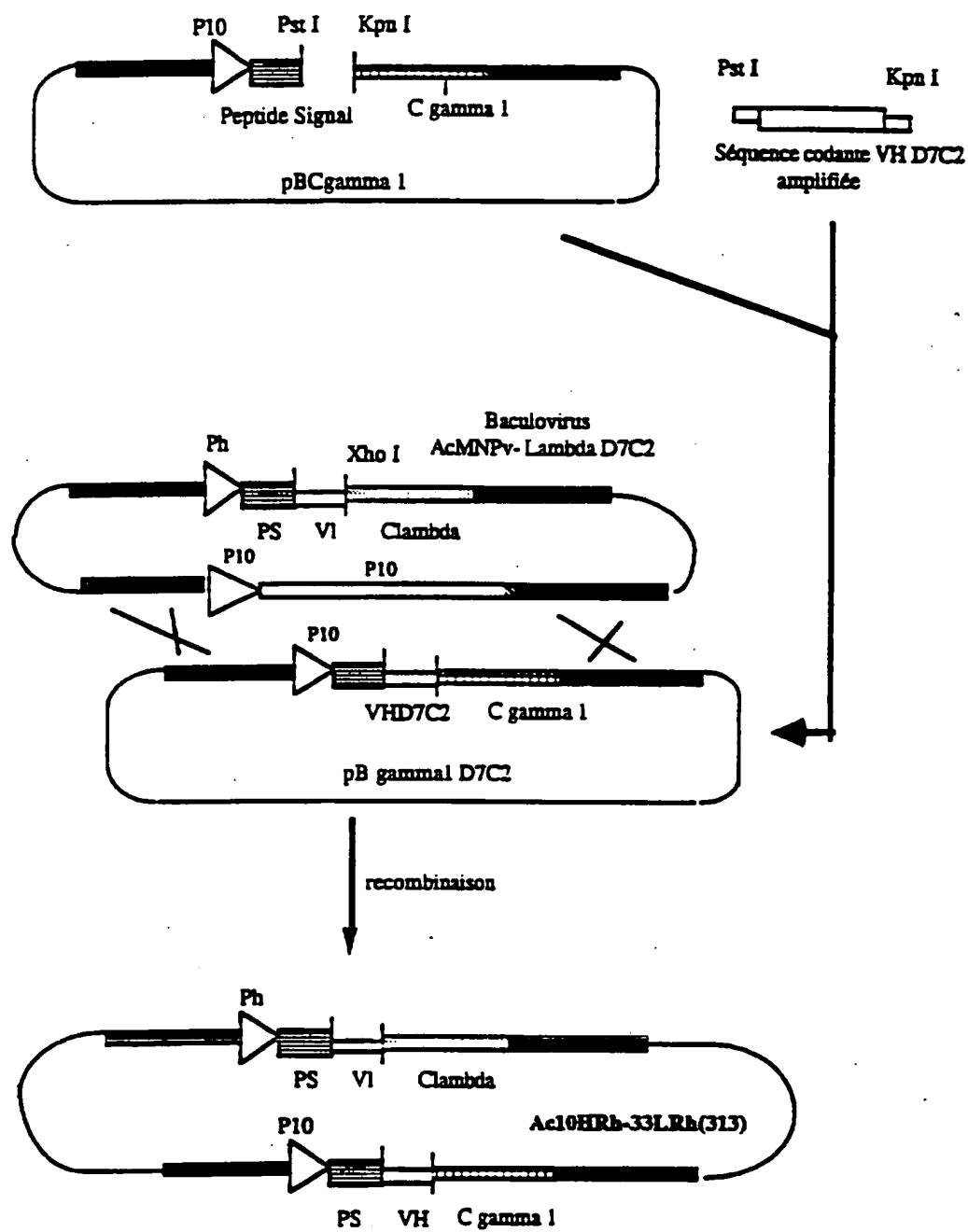
FIGURE 1



BEST AVAILABLE COPY

2/2

FIGURE 2



BEST AVAILABLE COPY

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01143

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/13 C07K16/34 A61K39/395 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,91 07492 (CENTRAL BLOOD LAB AUTHORITY) 30 May 1991 see the whole document ---	1-24
A	EP,A,0 345 152 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)) 6 December 1989 see the whole document ---	5-18
A	AUSTRALIAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE;, vol. 13, no. 2, May 1992 pages 43-47, STERN, D.A. ET AL.; 'Monoclonal anti-RHD from clone to consumer.' see the whole document ---	1-24
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 December 1995

Date of mailing of the international search report

28.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nauche, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Name:   
 International Application No.   
**PCT/FR 95/01143**

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION;, vol. 90, no. 6, December 1992 pages 2481-2490, BYE, J.M. ET AL.; 'Germline variable region gene segment derivation of human monoclonal anti-Rh(D)' see the whole document -----	1-24
A	BIOFUTUR, 1993, 125, 3-15, MORELLE C 'Expression de proteines heterologues' see the whole document -----	1-24

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Publication No

PCT/FR 95/01143

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9107492	30-05-91	AU-B- 647054	17-03-94
		AU-B- 6721490	13-06-91
		EP-A- 0500659	02-09-92
-----			
EP-A-0345152	06-12-89	FR-A- 2631974	01-12-89
		AU-B- 626867	13-08-92
		AU-B- 3529189	07-12-89
		JP-A- 2035092	05-02-90
		PT-B- 90687	31-10-94
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de l'Inst. nationale No

PCT/FR 95/01143

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/13 C07K16/34 A61K39/395 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,91 07492 (CENTRAL BLOOD LAB AUTHORITY) 30 Mai 1991 voir le document en entier ---	1-24
A	EP,A,0 345 152 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)) 6 Décembre 1989 voir le document en entier ---	5-18
A	AUSTRALIAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE;, vol. 13, no. 2, Mai 1992 pages 43-47, STERN, D.A. ET AL.; 'Monolconal anti-RHD from clone to consumer.' voir le document en entier ---	1-24
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie construisant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*A\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28.12.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patendaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nauche, S



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION;, vol. 90, no. 6, Décembre 1992 pages 2481-2490, BYE, J.M. ET AL.; 'Germline variable region gene segment derivation of human monoclonal anti-Rh(D)' voir le document en entier ---	1-24
A	BIOFUTUR, 1993, 125, 3-15, MORELLE C 'Expression de protéines heterologues' voir le document en entier -----	1-24

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D. de l'int. No

PCT/FR 95/01143

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO-A-9107492	30-05-91	AU-B- 647054	17-03-94
		AU-B- 6721490	13-06-91
		EP-A- 0500659	02-09-92
-----			
EP-A-0345152	06-12-89	FR-A- 2631974	01-12-89
		AU-B- 626867	13-08-92
		AU-B- 3529189	07-12-89
		JP-A- 2035092	05-02-90
		PT-B- 90687	31-10-94
-----			